



اثر مکمل‌های گیاهی زیره سیاه (*Carum carvi*) و شنبلیله (*Trigonella foenum graecum*) بر فعالیت ضدباکتریایی و پروتئین محلول موکوس در بچه‌ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

زهرا روحی*، محمدرضا ایمان‌پور، عبدالمجید حاجی مرادلو، محبوبه سلمانیان‌قهدریجانی

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در این مطالعه اثرات مکمل‌های گیاهی زیره سیاه و شنبلیله بر پروتئین محلول و فعالیت ضدباکتریایی موکوس در بچه‌ماهیان کپور معمولی (<i>Cyprinus carpio</i>) بررسی شد. ماهیان با میانگین وزنی $2/457 \pm 0/057$ گرم به طور تصادفی در ۷ تیمار (یک گروه شاهد و جیره‌های حاوی زیره سیاه و شنبلیله هریک با سه سطح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) با ۳ تکرار و ۱۵ عدد ماهی در هر تکرار توزیع شدند. بعد از ۸ هفته تغذیه، پروتئین و فعالیت ضدباکتریایی موکوس اپیدرم در برابر دو باکتری گرم منفی (<i>Escherichia coli</i> و <i>Serratia marcescens</i>) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سطوح پروتئین موکوس در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱٪ مکمل‌های گیاهی در مقایسه با گروه شاهد و سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). علاوه بر این، در میزان فعالیت ضدباکتریایی موکوس در ماهیان تغذیه شده با زیره سیاه و شنبلیله در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی موکوس در ماهیان تغذیه شده با زیره سیاه ۱٪ و شنبلیله ۱٪ مشاهده شد. این نتایج نشان داد که زیره سیاه و شنبلیله می‌تواند به طور مؤثری بر میزان پروتئین و فعالیت ضدباکتریایی موکوس پوست بچه‌ماهی کپور معمولی اثر گذار باشد.
کلمات کلیدی:	
پوست	
زیره سیاه	
شنبلیله	
کپور	
موکوس	

مقدمه

آبزی‌پروری یکی از سریع‌ترین بخش‌های تولید غذا بوده است که به طور گسترده در سلامت جهان نقش دارد. یکی از عمده‌ترین مشکلات رشد این بخش، ابتلاء ماهیان به بیماری‌های عفونی است (Zahran et al., 2014; Najiah et al., 2011). تقویت سیستم ایمنی یکی از روش‌های قابل اطمینان جهت جلوگیری از بیماری‌ها می‌باشد (Ardó et al., 2008). استفاده از محرک‌های ایمنی به عنوان مکمل‌های غذایی موجب بهبود دفاع ایمنی ماهیان می‌شود و نیز آن‌ها را در مقابل عوامل بیماری‌زا مقاوم می‌کند (Sakai, 1999). به همین دلیل در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی بر هورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و چندین مواد شیمیایی دیگر به منظور

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: roohi26_iut@yahoo.com

افزایش قدرت ایمنی، ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها و بهبود فاکتورهای رشد صورت گرفته است (Yuan *et al.*, 2007; Imanpoor *et al.*, 2011). از سوی دیگر، به علت هزینه بالا، مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا، مشکلات زیست محیطی، تجمع و باقی ماندن این مواد در بدن ماهی پرورشی، پایین آوردن کیفیت گوشت و نیز عدم رغبت مصرف‌کنندگان استفاده از هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها در تولید آبزیان توصیه نمی‌شود (Heidarieh *et al.*, 2010; Raa, 1996).

در چند دهه اخیر استفاده از گیاهان دارویی با توجه به مزیت‌های متعدد، از جمله خطرات زیست‌محیطی حداقل، عدم مقاومت دارویی، ارزان، پایدار و در دسترس بودن، توجهات زیادی را در سطح جهان به خود جلب نموده است (Chen *et al.*, 2003; Raja *et al.*, 2012). از این رو در بین محرک‌های ایمنی متعدد، محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی دارای ارجحیت می‌باشند (Alishahi *et al.*, 2012a; Alishahi *et al.*, 2012b). تحقیقات متعددی در خصوص استفاده از مکمل‌های گیاهی به عنوان محرک ایمنی در ماهیان مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال می‌توان به اثر سیر و چای سبز در قزل‌آلای رنگین کمان (Nya and Austin, 2011; Sheikhzadeh *et al.*, 2011)، رزماری و دارویش در تیلاپیا (Abutbul *et al.*, 2004; Park and Choi, 2012)، آویشن در کپور معمولی (Soltani *et al.*, 2010) و چای سبز در هامور (Harikrishnan *et al.*, 2011a) اشاره کرد. بدیهی است در کشور ما ضمن وجود تنوع و فراوانی گیاهان دارویی، زمینه‌های فراوانی برای تحقیقات و بهره‌گیری از این گیاهان وجود دارد.

شنبليله (*Trigonella foenum graecu*) گیاهی یکساله است که دارای دانه‌های غنی از پروتئین و برگ‌های آن سرشار از ویتامین‌ها و مواد معدنی است (Abdel-Zaher *et al.*, 2009). منشاء این گیاه غرب آسیا (ایران)، نواحی آفریقای شمالی و مدیترانه است. شنبليله غنی از فلاوونوئیدها و ساپونین‌ها است که نشان‌دهنده عملکردهای حفاظتی برای آسیب اکسیداتیو (Kosuga *et al.*, 2000) و خواص ایمنی می‌باشد (Bin-Hafeez *et al.*, 2003). همچنین دارای لکتین و کولین است که به حل‌شدن کلسترول و ترکیبات چربی، مواد معدنی، آهن، فسفات و ویتامین A و D کمک می‌کند (Ullah Khan *et al.*, 2009). اثرات مثبت این گیاه بر رشد و پاسخ ایمنی تیلاپیا (Abdel-Zaher *et al.*, 2009) و نیز رشد کپور معمولی (Roohi *et al.*, 2015a) تأیید شده است.

زیره سیاه (*Carum carvi*) گونه‌ای با پراکنش جهانی و سابقه دارویی از دوران باستان (Jayaprakas and Sambhu, 1996)، در نواحی شمالی خراسان، کرمان و شرق زاگرس می‌روید (Roohi *et al.*, 2015b). زیره سیاه فعالیت ضدقارچی و ضد میکروبی دارد و می‌تواند احساس نفخ یا سیری مربوط به سوء هاضمه را کاهش دهد که باعث ارتقاء رشد ماهی می‌شود. اثرات مثبت این گیاه بر رشد تیلاپیا (Ahmad and Abdel Tawwab, 2011) و کپور معمولی (Roohi *et al.*, 2015b) تأیید شده است.

پوست ماهیان عضوی با چندین عملکرد بوده که در شرایط محیط طبیعی، به عنوان یک سد محدود کننده با نیازهای فیزیولوژیکی بدن ماهی تطابق یافته است (Peyghan and Salamat, 2012). مهم‌ترین عملکرد پوست، ترشح موکوس است که توسط سلول‌های موکوسی انجام می‌گیرد (Hellio *et al.*, 2002). ماده موکوسی اطراف پوست به عنوان اولین سد دفاعی بدن ماهی در مقابل محیط خارجی، نقش مهمی در سلامت و بهداشت ماهیان ایفا می‌کند (Erfani Majd *et al.*, 2014). محققین طی گزارشات متعددی خواص ضدباکتریایی موکوس را در ماهیان مختلف نشان داده‌اند (Anbuezhian *et al.*, 2011; Bragadeeswaran *et al.*, 2011; Hirazawa *et al.*, 2011).

با توجه به اهمیت امر پیشگیری از بیماری‌ها در صنعت پرورش ماهی، افزایش ایمنی موکوس از طریق کاهش ریسک ابتلا به بیماری می‌تواند اثرات سودمندی داشته باشد. لذا در این مطالعه اثرات مکمل‌های گیاهی زیره سیاه و شنبليله، به عنوان محرک ایمنی، بر فعالیت ضدباکتریایی و پروتئین محلول موکوس بچه‌ماهیان کپور معمولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی

این پژوهش در تابستان ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این مطالعه، تعداد ۳۱۵ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی $2/457 \pm 0/057$ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی کلمه سیجوال در استان گلستان تهیه و به مدت دو هفته تحت سازگاری قرار گرفت. در طول دوره‌ی پرورش دمای آب 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در آب $5/9 \pm 0/65$ میلی‌گرم در لیتر و pH آب $7/8 \pm 0/07$ بود. توزیع به صورت کاملاً تصادفی با هفت تیمار و سه تکرار در هر سطح، به مدت ۸ هفته انجام شد. هر تیمار به میزان ۳٪ وزن بدن، ۴ بار در روز تغذیه می‌شدند (Yanbo and Zirong, 2006). هر دو هفته، ماهیان هر تیمار وزن می‌شدند و مقدار غذادهی براساس آن تنظیم می‌شد. مدفوع و دیگر مواد باقیمانده هر روز صبح از مخازن سیفون می‌شد. در هر آکواریوم ۱۵ قطعه ماهی قرار گرفت.

تهیه جیره‌های آزمایش

زیره سیاه و شنبلیله از بازار محلی تهیه و به صورت پودر شده از الک عبور داده شد. در این آزمایش از یک جیره غذایی پایه (جدول ۱) به عنوان شاهد، سه جیره آزمایشی بر اساس مکمل گیاهی زیره سیاه (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) و سه جیره آزمایشی دیگر براساس مکمل گیاهی شنبلیله (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در نظر گرفته شد (Abdel-Zaher et al., 2009; Ahmad and Abdel-Tawwab, 2011). مواد تشکیل‌دهنده هر تیمار با اضافه کردن مقداری آب ترکیب شده، خمیرهای تهیه شده از چرخ گوشت عبور داده شدند و پلت‌های مورد آزمایش ساخته شد. پلت‌های مرطوب در دمای اتاق به مدت ۲ روز خشک شدند. پس از خشک کردن، پلت‌ها شکسته شده تا اندازه مناسب پیدا نمایند. در پایان پلت‌ها در بسته‌های مناسب بسته‌بندی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Abdel-Zaher et al., 2009).

جمع‌آوری موکوس

موکوس ماهیان با استفاده از روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷)، با کمی اصلاحات، جمع‌آوری شد. غذادهی ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع شد. در پایان دوره از هر تشت ۱۰ قطعه ماهی صید و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (میلی‌گرم در لیتر) به منظور به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن و از بین رفتن سایر آلودگی‌ها، درون آب سرد و تمیز وارد شده و بلافاصله درون کیسه‌های زیپ‌پلاست حاوی ۵ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. پس از مدت زمان دو دقیقه ماهیان به تشت با اکسیژن مناسب منتقل شدند. موکوس از کیسه‌ها جمع‌آوری و مایع رویی آن در آزمایشگاه پس از سانتریفیوژ (با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به دست آمد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Salmaniyan Ghehdarijani et al., 2016).

بررسی فعالیت ضدباکتریایی موکوس

باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید که شامل باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC 1554) و *Serratia marcescens* (CIP 1621, SM) بود. پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع، به منظور مشاهده فعالیت ضدباکتریایی موکوس، از روش انتشار در دیسک استفاده شد (Chen et al., 2003). در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک‌فارلند روی سطح محیط کشت نوترینت آگار به صورت یکنواخت گسترده شد. همزمان دیسک بلانک‌های استریل (۷ میلی‌متر) آغشته به ۲۰۰ میکرولیتر نمونه موکوس با فاصله روی محیط کشت قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان، قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد. این آزمایش برای هر سویه چهار بار تکرار گردید.

سنجش پروتئین محلول

براي اندازه‌گيري پروتئين محلول از روش Lowry و همكاران (۱۹۵۱) و منحنى استاندارد آلومين سرم گاوى استفاده گرديد. اندازه‌گيري با اضافه نمودن معرف رنگى فولين فنول سيوكالتيو به ۱۰۰ ميكروليتر از نمونه‌هاي رقيق شده موكوس و استاندارد و قرائت نوري با استفاده از دستگاه اسپكتروفوتومتر (Biochrom, Libera S12) انجام گرفت. با انتقال جذب نوري به دست آمده به منحنى استاندارد، ميزان پروتئين محلول بر حسب ميلي گرم بر ميلي ليتر محاسبه شد.

آناليزهاي آماری

تجزيه و تحليل داده‌ها به روش آناليز واريانس يك طرفه و آزمون دانكن جهت مقايسه ميانگين‌ها انجام شد. تفاوت بين ميانگين داده‌هاي به دست آمده از تيمارهاي مختلف در سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ بررسي گرديد. تمام داده‌هاي متن براساس ميانگين \pm انحراف معيار، محاسبه شدند.

نتايج

فعاليت ضدباكتريايي موكوس با اندازه‌گيري قطر هاله عدم رشد، در برابر باكتري *Escherichia coli* و *Serratia marcescens* تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) بين تيمارهاي تغذيه شده با مكمل‌هاي گياهي و گروه شاهد نشان داد (شكل ۱ و ۲). بيشترين قطر هاله عدم رشد در ماهيان تغذيه شده با زيره سياه و شنبليله در سطح ۱٪ ثبت شد كه در مقايسه با ساير تيمارها اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده‌ی جیره پایه

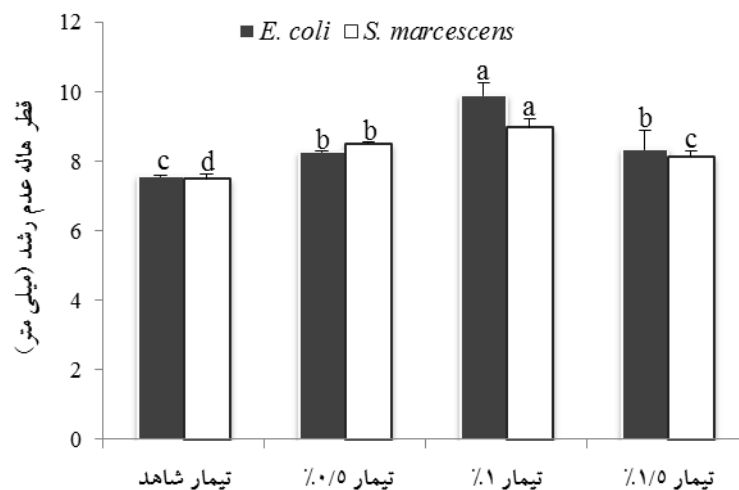
اجزای جیره (درصد)	اجزای جیره
۱۵	پودر ماهی
۵۳/۹۱	کنجاله سویا
۲۷/۰۵	آرد گندم
۱/۸۹	روغن آفتابگردان
۰/۳	مکمل املاح
۰/۳	مکمل ویتامین‌ها
۰/۴۱	دی‌آل‌متیونین
۰/۱	نمک معمولی
۱	ملاس
۰/۰۲	ویتامین E
۰/۰۲	ویتامین C

نتايج مربوط به سطوح پروتئين محلول موكوس در جدول ۲ آمده است. سطوح پروتئين محلول موكوس در بچه‌ماهيان كپور معمولی تغذيه شده با سطح ۱٪ زيره سياه در مقايسه با گروه شاهد افزايش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). با اين حال، ساير تيمارهاي اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($p > 0.05$). علاوه بر اين، ميزان پروتئين محلول در ماهيان تيمار شده با شنبليله ۱٪ افزايش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و ساير تيمارها نشان داد ($p < 0.05$). به طوري كه، بيشترين مقدار ($35/01 \pm 0/65$) در تيمار ۱٪ شنبليله و كمترين مقدار ($20/88 \pm 0/33$) در تيمار شاهد ثبت شد.

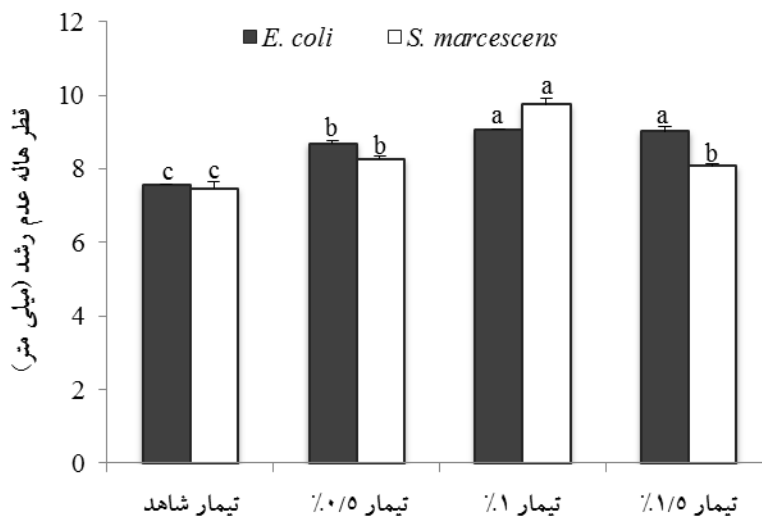
جدول ۲. مقايسه پروتئين محلول موكوس ابي درم ($mg \cdot mL^{-1}$) بچه‌ماهيان كپور معمولی تغذيه شده با زيره سياه و شنبليله

سپوع مختلف مكمل‌هاي گياهي (درصد)	۰	۰/۵	۱	۱/۵
ماهيان تغذيه با زيره سياه	$20/88 \pm 0/33^b$	$21/02 \pm 0/05^b$	$33/22 \pm 0/32^a$	$21/12 \pm 0/3^b$
ماهيان تغذيه شده با شنبليله	$20/88 \pm 0/33^b$	$21/79 \pm 0/65^b$	$35/01 \pm 0/65^a$	$22/34 \pm 0/26^b$

تذکر: حروف غير مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$



شکل ۱. مقایسه فعالیت ضدباکتریایی موکوس بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف زیره سیاه. ستون‌های مربوط به هر باکتری مشخص شده با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).



شکل ۲. مقایسه فعالیت ضدباکتریایی موکوس بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف شنبلیله. ستون‌های مربوط به هر باکتری مشخص شده با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

بحث

به حداقل رساندن تلفات ناشی از بیماری‌ها و کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از پیش‌نیازهای موفقیت در صنعت آبی‌پروری است (Eslamloo *et al.*, 2013a). مواد تشکیل‌دهنده گیاهان دارویی می‌تواند در بازگشت حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در شرایط فعلی به دلیل مقاومت دارویی قابلیت‌های درمانی خود را از دست داده‌اند، مؤثر باشند (Salmaniyan Ghehdarijani, 2014). اخیراً کاربرد مکمل‌های گیاهی جهت کنترل بیماری‌های عفونی در ماهیان افزایش یافته است (Harikrishnan *et al.*, 2011b).

مطالعات انجام شده بر تأثیر مکمل‌های گیاهی روی فعالیت ضدباکتریایی موکوس در ماهیان محدود است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به کارگیری مکمل‌های گیاهی زیره سیاه و شنبلیله در جیره بچه‌ماهیان کپور معمولی به طور معنی‌داری فعالیت ضدباکتریایی موکوس را افزایش می‌دهد. مطابق با این نتایج، Salmaniyan Ghehdarijani و همکاران (۲۰۱۶) افزایش معنی‌داری در فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهی کلمه تغذیه شده با مکمل گیاهی سیر مشاهده نمود. افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی در ماهیان تیمار شده با مکمل‌های گیاهی داروаш (Park and Choi, 2012)، زیره سبز (Raja Rajeswari *et al.*, 2012) و

زنجیل (Nya and Austin, 2009) نیز گزارش شده است. علاوه بر این، Vennila و همکاران (۲۰۱۱) و Narvaez و همکاران (۲۰۱۱) به ترتیب فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهیان گرمسیری و ماهی آزاد را مورد مطالعه قرار دادند. در همه گزارش‌ها بر فعالیت ضدباکتریایی موکوس تأکید شده است که با نتایج تحقیق حاضر همسو می‌باشد. در مطالعه حاضر بیشترین قدرت ضد باکتریایی موکوس بچه ماهیان کپور معمولی بر باکتری اشیریشیا کلی و سراسیا مارسسنس به ترتیب متعاقب مصرف زیره سیاه و شنبلیله هر یک در غلظت یک درصد مشاهده شد. حضور میزان بالای کومین آلدئید (حدود ۲۵ درصد) در زیره سیاه می‌تواند فعالیت ضدباکتریایی آن را توضیح دهد (Derakhshan *et al.*, 2011). از سوی دیگر، فعالیت ضد میکروبی شنبلیله به فنول‌ها و فلاونوئیدها نسبت داده شده است (Premanath *et al.*, 2011).

تاکنون وجود برخی از ترکیبات مهم ایمنی مانند ایمونوگلوبولین‌ها، لیزوزیم، آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین، لکتین‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک و سایر پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی در موکوس ماهیان گونه‌های مختلف به اثبات رسیده است (Kosuga *et al.*, 2012; Park and Choi, 2012; Subramanian *et al.*, 2007; Fast *et al.*, 2002; *al.*, 2000). از این رو افزایش میزان موکوس ترش‌چی در ماهیان می‌تواند نقش بسیار مهمی در تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی آن‌ها داشته باشد (Eslamloo *et al.*, 2013b). میزان پروتئین کل در موکوس نشان دهنده‌ی میزان ترشح و یا میزان موکوس موجود است (Yokoyama *et al.*, 2006).

سلول‌های کیسه‌ای شکل در اپیدرم ماهیان، با ترشح پروتئین‌هایی ماهیان را در برابر عفونت‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفظ می‌کنند. لکتین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها از جمله پروتئین‌هایی با باندهای کربوهیدراتی هستند که به همراه فاکتورهای دیگر موکوس به هنگام هجوم پاتوژن‌ها نقض آگلوتینه کردن آن‌ها را بر عهده دارند (Suzuki *et al.*, 2003). افزایش سطح پروتئین‌های موکوس به عنوان شاخص مناسبی برای وضعیت ایمنی غیر اختصاصی ماهیان مطرح است (Adel *et al.*, 2014). نتایج این مطالعه حاکی از افزایش میزان پروتئین محلول موکوس در ماهیان تغذیه شده با سطح ۱٪ مکمل‌های گیاهی زیره سیاه و شنبلیله بود. افزایش سطح پروتئین محلول موکوس در اثر به کارگیری مکمل‌های غذایی در مطالعات پیشین گزارش شده است. افزودن لاکتوفرین گاوی به جیره غذایی تاس ماهی سبیری جوان سبب افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین محلول نسبت به تیمار شاهد گردید (Eslamloo *et al.*, 2013b). افزایش پروتئین محلول نشان دهنده بیشتر بودن اجزاء دخیل در سیستم ایمنی با ساختار پروتئینی در ماهی‌هایی است که با مکمل‌های گیاهی تغذیه شدند که این مورد نیز از طریق بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی موکوس در این مطالعه نشان داده شده است.

با توجه به توسعه کمی پرورش ماهیان گرمابی در کشور و محدودیت‌های مختلف در افزایش بهره‌وری در پرورش این ماهی، استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی به عنوان راهکاری در توسعه کیفی این صنعت ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این تحقیق استفاده از زیره سیاه و شنبلیله به عنوان مکمل گیاهی را جهت افزایش ایمنی موکوس در کپور معمولی امکان‌پذیر می‌داند. براساس شرایط تعریف شده در آزمایش حاضر استفاده از زیره سیاه و شنبلیله به میزان یک درصد در جیره غذا پیشنهاد می‌شود.

منابع

- Abdel-Zaher, A., Mostafa, M., Ahmad, M.H., Mousallamy, A., Samir, A. 2009. Effect of using dried fenugreek seeds as natural feed additives on growth performance, feed utilization, whole-body composition and entropathogenic *Aeromonas hydrophila*-challenge of monsex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3: 1234-1245.
- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Zilberg, D. 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). Aquaculture. 238: 97-105.
- Adel, M., Safari, R., Nematollahi, A., Yeganeh, S., Ahmadvand, S. 2014. Effect of different levels of GroBiotic® -A probiotic on antibacterial activity and some immune parameters of *Huso huso*. Exploitation and Aquaculture Journal. 3(3): 99-110. (in Persian).

- Ahmad, M.H., Abdel Tawwab, M. 2011. The use of caraway seed meal as a feed additive in fish diets: growth performance, feed utilization, and whole-body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture*. 314: 110-114.
- Alishahi, M., Mesbah, M., Namjoyan, F., Sabzevari-Zadeh, M., Razijalali, M. 2012a. Effect compare of some immune stimulants of chemicals and plants in *Astronotus ocellatus*. *Iranian Veterinary Journal*. 8(2): 58-68. (in Persian).
- Alishahi, M., Soltani, M., Meshah, M., Zargar, A. 2012b. Immunostimulatory and growth stimulation effects of ergosan, levamisol and herbal extracts in *Cyprinus Carpio*. *Journal of Veterinary Research*. 67(2): 135-142. (in Persian).
- Anbuchezhian, R., Gobinath, C., Ravichandran, S. 2011. Antimicrobial peptid from the epiderm mucus of some esturine cat fishes. *World Applied Sciences Journal*. 12: 256-260.
- Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Sziget, G., Jeney, Z., Jeney, G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. 275: 26-33.
- Bin-Hafeez, B., Haque, R., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I., Raisuddin, S. 2003. Immunomodulatory effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) extract in mice. *International Immunopharmacology*. 3(2): 257-265.
- Bragadeeswaran, S., Priyadharashini, S., Prabhu, K., Rani, R.S.S. 2011. Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus *Cynoglossus arel* and *Arius caelatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4: 305-309.
- Chen, X., Wu, Z., Yin, J. 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Fish Sciences of China*. 10: 36-40.
- Derakhshan, S., Sattari, M., Bigdeli, M., Zarei-Eskikand, N. 2011. Antibacterial activity of essential oils from Artemisia and Cumin plants against Staphylococcus aureus, Escheriachia coli and Vibrio cholera. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*. 15(1): 7-14. (in Persian).
- Erfani Majd, N., Mesbah, M., Esfandiary, K. 2014. Distribution and histochemical studies of Goblet mucous cells in different regions of epidermis in mature male and female silver carp fish. *Iranian Veterinary Journal*. 10(3): 65-75. (in Persian).
- Eslamloo, K., Akhavan, S.R., Henry, M.A. 2013a. Effects of dietary administration of bacillus probiotics on the non-specific immune responses of tinfoil barb, barbonymus schwanenfeldii (Actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 43: 211-218.
- Eslamloo, K., Falahatkar, B., Uokoumaya, S., Abbasalizadeh, U. 2013b. Feed effect with different levels of bovinelactoferrin on growth performance and serum lysozyme activity and mucus of Siberian sturgeon young. *Iranian Veterinary Journal*. 9(2): 5-16. (in Persian).
- Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, G.F., Mustafa, A., Ross, N.W. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucous and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 132(3): 645-657.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011a. Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 972-979.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011b. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*. 317: 1-15.
- Heidarieh, M., Afsharnasab, M., Soltani, M., Dashtyannasab, A., Rajabifar, S., Sheikhzadeh, N. 2010. Effects of ergosan and vibromax to prevent vibriosis and WSSV in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 5: 120-125.
- Hellio, C., Pons, A.M., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., Le, Gal, Y. 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 20: 214-219.
- Hirazawa, N., Hagiwara, H., Takano, R., Noguchi, M., Narita, M. 2011. Assessment of acquired protection levels against the parasite *Neobenedenia girellae* (Monogenea) between body surface site including fins

- of amberjack *seriola dumerili* (Carangidae) and the skin in response to the parasite infection. *Aquaculture*. 310: 252-258.
- Imanpoor, M.R., Ahmadi, A.R., Kabir, M. 2011. Effects of sub lethal concentration of Chloramin T on growth, survival, hematocrit and some blood biochemical parameters in common carp fry (*Cyprinus carpio*). *AAFL Bioflux*. 4(3): 280-291.
- Jayaprakas, V., Sambhu, C. 1996. Growth response of white prawn (*Penaeus indicus*) to dietary L-carnitine. *Asian Fisheries Science*. 9: 209-219.
- Kosuga, Y., Mano, N., Hirose, H. 2000. Bacterial agglutinins in the skin mucus of Japanese ell. *Fish Pathology*. 35: 73-77.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Najiah, M., Nadirah, M., Arief, Z., Zahrol, S., Tee, L.W., Raniz, A.D., Amar, A.S., Laith, A.A., Mariam, M., Suzana, S., Aida, R.J. 2011. Antimicrobial activity of Malaysian edible herbs extracts on fish pathogenic bacteria. *Research Journal of Medicinal Plant*. 5(6): 772-778.
- Narvaez, E., Berendsen, J., Guzman, F., Gallardo, G.A., Mercado, L. 2011. An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* skin mucus. *Fish and Shellfish Immunology*. 28: 235-239.
- Nya, E.J., Austin, B. 2009. Use of dietary ginger (*Zingiber officinale*) as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases*. 32: 971-977.
- Nya, E.J., Austin, B. 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 845-850.
- Park, K.H., Choi, S.H. 2012. The effect of mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on innate immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 32: 1016-1021.
- Peyghan, S., Salamat, N. 2012. Study of changes in the structure skin texture of *Carassius auratus* in Ahvaz city. *Histobiology Veterinary Journal*. 1(1): 1-4. (in Persian).
- Premanath, R., Sudisha, J., Lakshmi, Devi, N., Aradhya, S.M. 2011. Antibacterial and Anti-oxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) leaves. *Research Journal of Medicinal Plants*. 5(6): 695-705.
- Raa, J. 1996. The use of immune-stimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*. 4: 229-288.
- Raja Rajeswari, P., Velmurugan, S., Michael Babu, M., Albin Dhas, S., Kesavan, K., Citarasu, T. 2012. A study on the influence of selected Indian herbal active principles on enhancing the immune system in *Fenneropenaeus indicus* against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture International*. 20: 1009-1020.
- Roohi, Z., Imanpoor, M.R., Jafari, V., Taghizadeh, V. 2015a. The use of fenugreek seed meal in fish diets: growth performance, haematological and biochemical parameters, survival and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/are.12962.
- Roohi, Z., Imanpoor, M.R., Jafari, V., Taghizadeh, V. 2015b. Effect of different levels of caraway on growth performance and some blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Environment*. 7(1): 105-112. (in Persian).
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.
- Salmaniyan Ghehdarijani, M. 2014. Dietary effects of garlic on mucus parameters, growth and survival in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). Thesis for the degree of M.Sc. in fisheries sciences. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. 56p. (in Persian).
- Salmaniyan Ghehdarijani, M., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Roohi, Z. 2016. The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*. 49: 79-83.
- Sheikhzadeh, N., Nofouzi, K., Delazar, A., Khani Oushani, A. 2011. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 31: 1268-1269.

- Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A. 2010. Effects of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 5(3): 191-199.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology. 148: 256-263.
- Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comparative Biochemistry and Physiology. 136: 723-730.
- Ullah Khan, F., Durrani, F.R., Sultan, A., Ullah Khan, R., Naz, S. 2009. Effect of fenugreek seed extract on visceral organs of broiler chicks. ARPN Journal of Agriculture and Biological Science. 4(1): 58-60.
- Vennila, R., Kummar, K.R., Kanchana, S., Arumugam, M., Vijayalakshmi, S., Balasubramaniam, T. 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingray. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1(2): 239-243.
- Yanbo, W., Zirong, X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology. 127: 283-292.
- Yokoyama, S., Koshio, S., Takakura, N., Oshida, K., Ishikawa, M., Gallardo-Cigarroa, F.J., Catacutan, M.R., Teshima, S. 2006. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Aquaculture. 255: 507-513.
- Yuan, C., Li, D., Chen, W., Sun, F. 2007. Administration of herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiology and Biochemistry. 10: 1007-1120.
- Zahran, E., Risha, E., Abdellhamid, F., Mahgoub, H.A., Ibrahim, T. 2014. Effects of dietary *Astragalus* polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology. 38: 149-157.